

ОБ ИЗМЕНЧИВОСТИ ТОКСОПЛАЗМ
МАЛОВИРУЛЕНТНОГО ШТАММА

М. А. Савина

Лаборатория токсоплазмоза ИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР, Москва

Выяснялась устойчивость признака низкой вирулентности у чешского штамма токсоплазм при частом (через 7 дней) пассировании на белых мышах. В 5 из 11 серий пассажей произошло усиление его вирулентности.

Вопрос о причинах и условиях изменчивости вирулентности у токсоплазм изучен недостаточно. По данным многих авторов, при экспериментальном пассировании токсоплазм на животных неоднократно отмечались случаи изменения вирулентности паразитов, причем эти изменения носили различный характер. В литературе чаще всего сообщают о случаях усиления вирулентности свежевыделенных штаммов после нескольких, чаще двух-трех пассажей на мышах (Sabin и Olitsky, 1937; Sureau и Uilenberg, 1963; Vermeil, Pennec и Senelar, 1965, и мн. др.).

Усиление вирулентности токсоплазм может также происходить после длительного пассирования маловирулентных токсоплазм на мышах. Шимицу (Shimizu и др., 1967) отмечали усиление вирулентности штамма S-273 после семи быстрых пассажей на мышах, после 16 пассажей степень инвазивности токсоплазм достигла уровня вирулентного штамма RH. Jacobs и Melton (1954) наблюдали усиление вирулентности штамма 113 после 7 пассажей на белых мышах с интервалом 10 дней—1 месяц. Токсоплазмы штамма B-316, выделенного от бандикута, усилили вирулентность между 64 и 84 пассажами на белых мышах с интервалом 14—28 дней (Pope, Derrick a. Cook, 1957). По данным Рёвер-Боннет (Roever-Bonnet, 1965), штамм Burk после 27 пассажей на мышах усилил вирулентность по отношению к золотистым хомячкам. Эйлис, Кольман и Джибсон (Eyles, Coleman a. Gibson, 1957) наблюдали усиление большинства из 6 относительно маловирулентных штаммов, выделенных от различных хозяев, к 20-му пасажу на мышах. Для всех этих случаев изменения вирулентности характерным было постепенное ее усиление на протяжении нескольких пассажей.

Однако не всегда удается вызвать изменение вирулентности токсоплазм длительным пассированием. Так, по данным Лейнсон (Lainson, 1955), токсоплазмы маловирулентного штамма RB₂₅ не изменили вирулентности после 14 пассажей с недельным интервалом со смывами перитонеальной полости и после одного года пассирования с интервалом 2—4 недели.

Наконец, известны случаи внезапного усиления вирулентности длительно пассируемых на мышах маловирулентных штаммов (кроличий RB₂₅ и Burk) после одного пассажа на многососковых крысах *Mastomys coucha* или на молодых песчанках (Lainson, 1958; Roever-Bonnet, 1965). Причем, в этих случаях токсоплазмы оказывались весьма патогенными для нового вида хозяев и по отношению к белым мышам.

Изучение изменчивости токсоплазм проводится в нашей лаборатории в разных аспектах (Акиншина, Засухина, 1966; Акиншина, 1968; Акиншина, Засухин, 1969).

Мы решили выяснить устойчивость признака низкой вирулентности маловирулентного штамма и возможность его поддержания при частых пассажах на мышах по типу вирулентного штамма. Был использован маловирулентный штамм токсоплазм, выделенный в Чехословакии от зайца, сохранявший низкую вирулентность на протяжении 5 лет пассирования в нашей лаборатории. Токсоплазмы этого штамма отличаются медленным темпом размножения в организме мышей, низким уровнем паразитемии, чрезвычайно низкой обсеменяемостью пролиферативными формами внутренних органов и образованием в головном мозгу мышей значительного числа цист. При внутрибрюшинном заражении мышей обычно образуется лишь пристеночный экссудат, в клетках которого преимущественно происходит размножение токсоплазм в первую неделю после заражения.

В отличие от обычного способа поддержания этого штамма перевивками цист токсоплазм с тканью головного мозга мышей с интервалом 2—3 месяца проводилось пассирование паразитов через каждые 7 дней. Проведено 11 серий пассажей по 7—15 пассажей в каждой серии на 12—15- и 18—20-граммовых мышах, обработанных (в четырех сериях по 3.75 мг каждая в 3 приема) или необработанных кортизоном. Заражение токсоплазмами проводилось внутрибрюшинно с суспензией печени и селезенки, мозга или смывами брюшной полости (так как свободного эксудата обычно не бывает) от ранее зараженных мышей. Вначале смывы брались от двух-трех забиваемых мышей, затем прижизненно у наркотизированных мышей. В восьми сериях пассажей использовались мыши линии CC57W, в трех сериях — беспородные мыши.

В четырех сериях пассажей токсоплазм с суспензией органов штамм не удалось поддерживать до конца опытов и в разных сериях пассажей он был утерян на 7—9-м пассажах по серологическим данным (РСК) и на 4—6-м по микроскопическим данным (пролиферативные формы в отпечатках органов на 7-й день после заражения или цисты в головном мозгу мышей через 1.5 месяца после заражения). В двух сериях пассажей аналогичным материалом, где мыши обрабатывались кортизоном, токсоплазмы в экссудате микроскопически обнаруживались до конца опытов (14-е и 15-е пассажи), но усиления вирулентности не отмечалось (более подробно см: Савина, 1969).

Изменение вирулентности токсоплазм в сторону повышения отмечалось в 5 сериях пассажей только при их перевивках (внутрибрюшинно) с перитонеальным экссудатом или смывами брюшной полости. Усиление вирулентности отмечалось как при пассировании на беспородных мышах (3 серии, в том числе 1 с обработкой мышей кортизоном), так и на линейных мышах (2 серии, в том числе 1 с обработкой кортизоном) с той разницей, что на первых токсоплазмы повышали вирулентность быстрее (в двух случаях на 5-м пассаже и в одном на 8-м), чем на вторых (на 9-м и 11-м). Применение кортизона ускорило процесс усиления вирулентности токсоплазм на 3 пассажа на беспородных мышах и на 2 пассажа на линейных мышах.

При пассировании токсоплазм со смывами брюшной полости или с перитонеальным экссудатом пролиферативные формы к моменту перевивок обнаруживались в небольшом количестве и не на всех пассажах.

Представляет интерес проанализировать условия и процесс усиления вирулентности токсоплазм. В одной из наиболее изученных серий пассажей на беспородных мышах, не обработанных кортизоном, усиление вирулентности происходило постепенно с 5 по 13-й пассаж. Первым признаком повысившейся вирулентности было появление свободного перитонеального эксудата (3 мл у одной из 5 мышей) с очень незначительным количеством токсоплазм. На следующем пассаже экссудат (1 мл) также был обнаружен только у одной мыши, и в 200 полях зрения мазка из него была найдена единственная делящаяся токсоплазма. Из 5 зараженных мышей 2 были забиты для перевивки, а остальные не болели и были забиты на 35-й день.

На следующих 3 пассажах отмечалось неуклонное увеличение числа токсоплазм, до 17—22 млн на 9-м пассаже. Максимальное количество пролиферативных токсоплазм исходного маловирулентного штамма, отмеченное нами, не превышало 8 млн. Более подробные данные об этих 3 пассажах приведены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1
Заболеемость мышей, количество эксудата и токсоплазм
в нем и период усиления вирулентности штамма

№ пассажа	Заболевания мышей (в днях)	Количество		
		эксудата (в мл) на 7-й день	токсоплазм в эксудате в 100 полях зрения	токсоплазм (в млн) в 1 мл эксудата
7	7	1.3	18	} Не подсчитано
	7	1.2	1	
	12	0.25	—	
	43	—	—	
8	7	0.25	9	} Не подсчитано
	8	4.2	8	
	8	1.6	24	
	16	1.1	170	
	30	0.8	31	
9	4	2.0	—	7.5
	6	2.4	380	22
	6	2.5	436	17
	6	2.6	15	0.6

Т а б л и ц а 2
Инвазионность токсоплазм по отношению к тканям печени, селезенки
и мозга на 13-м пассаже (7-й день после заражения)

Число токсоплазм в 1 мл перитонеального эксудата	Число токсоплазм в 100 полях зрения мазков и отпечатков			
	эксудата	печени	селезенки	мозга
20100000	Не подсчитано	10	8	15
17300000	230	73	—	20
12900000	Не подсчитано	4	—	2
11175000	400	1	—	—
2850000	170	10	—	—

Как уже отмечалось, обсемененность пролиферативными формами маловирулентных токсоплазм внутренних органов мышей очень низка и найти их в отпечатках внутренних органов на 7—10-е дни после заражения не всегда удается. Вскоре после усиления вирулентности штамма (на 9—10-м пассажах) мы не отмечали увеличения обсемененности токсоплазмами внутренних органов. При количестве 7.5—22 млн токсоплазм в 1 мл перитонеального эксудата в отпечатках печени, селезенки, легких и мозга паразитов по-прежнему найти было трудно. Лишь после 12-го пассажа инвазивность токсоплазм по отношению к внутренним органам (преимущественно к печени, а также к мозгу) повысилась, но никогда не достигала уровня, свойственного штамму РН (табл. 2).

При дальнейшем пассировании штамма не отмечалось увеличения токсоплазм в перитонеальном эксудате. На 7-й день после заражения обычно их насчитывалось от 350 тыс. до 3—9 млн, реже 20—25 млн, максимальное число — 82 млн. При регулярных перевивках внутрибрюшинно по 10 тыс.

токсоплазм летальность мышей достигала 95—98 %, постоянно имелся свободный эксудат. Гибель большинства мышей наблюдалась на 7—10-й день, часть мышей выживала более длительный срок. В целом вирулентность полученного подштамма не достигла уровня штамма RH (табл. 3).

Мы решили также выяснить, не происходит ли реверсии вирулентности полученного подштамма к исходной низкой. Для этого от мозга мышей, выживших после заражения токсоплазмами вирулентного подштамма на 24, 25, 30, 36, 42 и 45 пассажах, были заражены по 4 мыши и от них проведено по 3 последующих пассажа внутрибрюшинно токсоплазмами из эксудата. Выяснилось, что штамм сохранил свою вирулентность для мышей — животные погибали на 7—12-й день, но количество токсоплазм в эксудате, как правило, было небольшим.

Представляло также интерес выяснить, изменились ли с усилением вирулентности иммунологические свойства полученного вирулентного подштамма. Исходный маловирулентный штамм не вызывал образования иммунитета к штамму RH. Из 96 мышей, иммунизированных этим штаммом и затем зараженных через различные сроки (1 и 2 недели, 1, 2, 3 и 6 месяцев) по 100 токсоплазм штамма RH, выжило 18.2 % мышей, в контроле — 12.9 %. Не отмечено корреляции между уровнем антител по РСК у иммунизированных животных и длительностью выживания после повторного заражения. Мыши (35 животных), выжившие после заражения вирулентным подштаммом и имевшие антитела по РСК, так же не приобрели иммунитета по отношению к штамму RH — все животные погибли после повторного заражения 1000 токсоплазмами штамма RH. С одной стороны, иммунизация маловирулентным штаммом токсоплазм полностью предохраняла животных от заболевания при заражении вирулентным подштаммом. Иммунизированные мыши (20 животных) при заражении через 2 месяца 100 тыс. токсоплазм вирулентного подштамма не проявляли признаков заболевания.

Таблица 3
Сравнение вирулентности исходного маловирулентного штамма и его вирулентного подштамма для белых мышей

Вводимая доза	Маловирулентный штамм	Вирулентный подштамм	Гибель мышей (в днях)
5 тыс.	$\frac{1}{15}$	—	13
100 тыс.	$\frac{2}{15}$	—	11—13
500 тыс.	$\frac{10}{10}$	—	7—12
1 млн.	$\frac{10}{10}$	—	7—10
1 тыс.	—	$\frac{1}{10}$	8—10
10 тыс.	—	$\frac{10}{10}$	8—9
100 тыс.	—	$\frac{10}{10}$	6—7

Примечание. В дроби: в числителе — число погибших мышей, в знаменателе — число зараженных.

ОБСУЖДЕНИЕ

При внутрибрюшинном заражении мышей маловирулентными токсоплазмами на 7-й день обсемененность ими внутренних органов очень низка. По данным Ито и сотрудников (Ito, 1967), размножающиеся токсоплазмы маловирулентного штамма Beverley во внутренних органах обнаруживались начиная с 8-го дня после заражения. По-видимому, этим и можно объяснить потери штамма при частом пассировании токсоплазм с суспензией внутренних органов.

Перитонеальный эксудат — первичный очаг размножения паразитов, где к 7-му дню отмечается их максимальная концентрация. В связи с этим при использовании метода частого пассирования материала при выделении токсоплазм, чтобы избежать потерю маловирулентных паразитов, целесооб-

разнее использовать смывы брюшной полости или эксудата, а не суспензии внутренних органов.

Пассирование токсоплазм со смывом брюшной полости с 7-дневным интервалом, по-видимому, дает наибольшую возможность селекции быстро размножающихся особей токсоплазм. Во всех 5 случаях пассирования токсоплазм с перитонеальным эксудатом или смывами мы наблюдали усиление их вирулентности. Интересно, что потребовалось всего лишь 5—7 быстрых пассажей для повышения вирулентности штамма, который в течение 5 лет сохранял низкую вирулентность при обычном режиме редкого пассирования.

Применение кортизона ускоряло процесс повышения вирулентности на 2—3 пассажа. Такой же факт отмечали Эйлис (Eyles и др., 1957). Однако кортизон не оказывал влияния на степень вирулентности получаемых подштаммов. Усиление вирулентности токсоплазм, пассируемых на мышах линии CC57W, на более поздних пассажах, чем на беспородных мышах, связано, по нашему мнению, с меньшей чувствительностью первых по отношению к этим паразитам и меньшим уровнем их размножения в эксудате мышей этой линии. Таким образом, на основании ряда фактов можно считать, что при пассировании токсоплазм на одном и том же виде животных в процессе усиления вирулентности паразитов имеет значение их количественное содержание в перевиваемом материале.

Исходя из наших данных, можно считать, что штаммы токсоплазм, выделенные после 5 быстрых пассажей (или позднее) как вирулентные, обладали низкой исходной вирулентностью. Гавлик и Гюбнер (Havlik и Hübner, 1960), выделявшие токсоплазм пассированием материала с 10-дневным интервалом, также рассматривали штаммы, выделенные на 5—7-м пассажах, как маловирулентные. Таким образом, метод выделения может оказывать влияние на характер получаемых штаммов.

Интересен факт выявления иммунологического различия маловирулентного штамма токсоплазм, его вирулентного подштамма, с одной стороны, и штамма RH — с другой. Чаще всего сообщается об иммунологическом сходстве маловирулентных и вирулентных штаммов токсоплазм, хотя имеются работы с противоположными выводами (Pore, Bicks a. Cook, 1957; Shinzato, 1968).

ВЫВОДЫ

1. При пассировании токсоплазм маловирулентного чешского штамма с интервалом 7 дней в 5 из 11 серий пассажей наблюдалось усиление вирулентности токсоплазм.
2. Усиление вирулентности токсоплазм происходило только при пассировании их внутрибрюшинно с перитонеальным эксудатом или смывами брюшной полости.
3. Усиление вирулентности наблюдалось как на беспородных, так и на линейных мышах CC57W, на первых оно отмечалось на 3—4 пассажа раньше, чем на вторых. Применение кортизона ускоряло процесс усиления вирулентности на 2—3 пассажа.
4. Усиление вирулентности происходило постепенно. Первым признаком повысившейся вирулентности токсоплазм было появление перитонеального эксудата, затем увеличение числа токсоплазм в нем и повышение летальности мышей. В последнюю очередь наблюдалось усиление инвазивности по отношению к внутренним органам.
5. Токсоплазмы исходного маловирулентного штамма не вызывают иммунитета у мышей по отношению к штамму RH. С усилением вирулентности это свойство не изменилось. Полученный вирулентный подштамм оказался иммунологически сходен с исходным штаммом.
6. Выделение новых штаммов токсоплазм при режиме частого пассирования материала может приводить к повышению их вирулентности в процессе выделения. При использовании указанного метода выделения токсо-

плазм, чтобы не потерять мало вирулентные штаммы, целесообразнее пассивировать внутрибрюшинно смывы брюшной полости или эксудат, а не суспензии внутренних органов.

Л и т е р а т у р а

- А к и н ш и н а Г. Т. 1968. К изучению изменчивости токсоплазм. I. Изучение состава популяции старого лабораторного штамма RH. Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 6 : 657—660.
- А к и н ш и н а Г. Т. и З а с у х и н а Г. Д. 1966. Метод исследования мутаций у Protozoa (*Toxoplasma gondii*). Генетика, 8 : 71—76.
- А к и н ш и н а Г. Т. и З а с у х и н Д. Н. 1969. Материалы к изучению изменчивости токсоплазм. 2. Получение лекарственноустойчивых клонов *Toxoplasma gondii* in vitro. Усп. протозоол. III Международн. конгресс протозоол. Л. : 234.
- С а в и н а М. А. 1969. Поддержание мало вирулентного штамма токсоплазм при различных условиях пассивирования. Усп. протозоол. III Международн. конгресс протозоол. Л. : 257—258.
- Eyles D., Coleman N. a. Gibson C. 1957. Changes in virulence to laboratory mice of newly isolated strains of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol., 43 (5), Section 2 (Suppl.) : 1—39.
- Havlik O. u Hübner J. 1960. Výskyt toxoplasmózy v chovech králiků v ČSR. Českosl. Epidem. Microbiol., Immunol., 9 (1) : 16—22.
- Jacobs L. a. Melton M. 1954. Modification in virulence of a strain of *Toxoplasma gondii* by passage in various hosts. Am. J. Trop. Med. Hyg., 3 (3) : 447—457.
- Ito S., Tsunoda K. a. Suzuki K. 1967. Distribution of *Toxoplasma gondii*, RH strain in infected mice as determined by the fluorescent antibody technique and the histopathology of toxoplasmosis. Nat. Inst. Anim. Health. Quart. : 202—214.
- Lainson R. 1955. Toxoplasmosis in England. II. Variation factors in the pathogenesis of *Toxoplasma* infections: the sudden increase in virulence of a strain after passage in multimammate rats and canaries. Ann. Trop. Med. and Parasitol., 49 (4) : 397—416.
- Lainson R. 1958. Observation on the development and nature of pseudocysts and cysts of *Toxoplasma gondii*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 52 (5) : 396—407.
- Pope J., Bicks V. a. Cook J. 1957. *Toxoplasma* in Queensland. II. Natural infections in bandicoots and rats. Austr. J. Experim. Biol. and Med. Sci., 35 (5) : 481—490.
- Pope J., Derrick E. a. Cook J. 1957. *Toxoplasma* in Queensland. I. Observation on a strain of *Toxoplasma gondii* isolated from a bandicoot, *Thylacis obesulus*. Austr. J. Exper. Biol. and Med. Sci., 35 (5) : 467—479.
- Roever-Bonnet H. de. 1966. Changed virulence of *Toxoplasma* strain. Proc. of the 1-st Intern. Congress of Parasitology, Oxford—London—Edinburgh—New York : 1—165.
- Sabin A. a. Olitsky P. 1937. *Toxoplasma* and obligate intracellular parasitism. Science, 85 (2205) : 336—338.
- Shimizu K., Kito Shoji a. Shirahata Toshikazu. 1967. Experiments on mouse passage of the cyst type strain of *Toxoplasma gondii* for enhancement of virulence. Japan J. Veterin. Sci., 29 (2) : 71—78.
- Shinzato J. 1968. Immunological study on *Toxoplasma gondii* pathogenicity and protective antigenicity of Beverley strain in different mouse strains. Japan. J. Parasitol., 17 (5) : 429—435.
- Sureau P. et Uilenberg G. 1963. Isolement á partir d'un pigeon domestique d'une seconde souche de *Toxoplasma gondii* á Madagascar. Arch. Inst. Pasteur Madagascar, 32 (1) : 47—53.
- Vermeil C., Pennec J. et Senelar R. 1965. Toxoplasme en Vendée. Contribution á l'étude du réservoir de virus animal: le lapin. Bull. Soc. pathol. exot. (1966), 58 (6) : 1040—1049.

ON VARIABILITY OF TOXOPLASM OF LITTLE-VIRULENT STRAIN

M. A. Savina

S U M M A R Y

There was ascertained the tolerance of the low virulence property in the Czech strain at frequent (in 7 days) passing on white mice. In 6 of 11 series of passages there was observed an increase of strain virulence. Toxoplasms of the parental little-virulent strain fail to cause the immunity to toxoplasms of RH strain. Increasing virulence does not change this property.